

1/19/1 DIALOG(R)File 351:Derwent WPI (c) 2006 The Thomson Corp. All rts. reserv.

011763143

WPI Acc No: 1998-180053/199817

XRAM Acc No: C98-057899

**Synthesis of nucleic acid molecules - by attachment of
single-stranded molecules to double-stranded starter**

Patent Assignee: BERNAUER H S (BERN-I)

Inventor: BERNAUER H S

Number of Countries: 001 Number of Patents: 002

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
DE 19633427	A1	19980319	DE 1033427	A	19960820	199817 B
DE 19633427	C2	20011004	DE 1033427	A	19960820	200157

Priority Applications (No Type Date): DE 1033427 A 19960820

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan	Pg	Main IPC	Filing Notes
DE 19633427	A1	18		C12P-019/34	
DE 19633427	C2			C12P-019/34	

Abstract (Basic): DE 19633427 A

Process for the synthesis of nucleic acid molecules with an at least partially predetermined nucleotide sequence, comprises:

- (a) providing a double-stranded nucleic acid molecule;
 - (aa) which has an overhang with an at least partially defined nucleotide sequence at at least one end or in which at least one such overhang can be generated, or
 - (ab) which has a blunt end with an at least partially defined nucleotide sequence at at least one end or in which at least one such end can be generated;
- (b) attaching at least one single-stranded nucleic acid molecule to the double-stranded nucleic acid molecule, wherein the single-stranded nucleic acid molecule attaches to the overhang, if necessary after its generation, according to (aa) or to the blunt end, if necessary after its generation, according to (ab) and in its turn generates an overhang and wherein the single-stranded molecule in the case of attachment to a blunt end, or in the case of successive attachment and coupling of several single-stranded molecules before the filling-in reaction is masked at the end removed from the end of the double-stranded molecule;
- (ba) removing the mask in the case of successive attachment of several single strands, in each case before coupling;
- (c) filling in the second nucleic acid strand complementary in sequence to the single strand by a polymerase activity;
- (d) cleaving the at least 1 double-stranded nucleic acid molecule produced in step (c) at a predetermined site, whereby at least 1 new overhang or one blunt end results and wherein any mask still present is removed;
- (e) optionally repeating steps (b), (c) and/or (d) one or more times, wherein suitable single-stranded molecules are used in each case in step (b);
- (f) ligating the 3'-hydroxy and 5'-phosphate ends of the terminal nucleotides of adjacent single-stranded nucleic acid molecules incorporated into the double-stranded nucleic acid molecule, as there are blunt ends, after step (b), (c), (d) and/or (e), and
- (g) isolating the double-stranded nucleic acid molecule thus produced.

Also claimed is a kit comprising:

- (a) a ligase and a ligase buffer;

- (b) a polymerase and a synthesis-specific polymerase buffer;
- (c) type II S-restriction enzyme and buffer;
- (d) a wash buffer for eluting the reaction by-products, and optionally
- (e) a synthesis matrix, optionally with an already attached double stranded nucleic acid molecule.

ADVANTAGE - The object is to provide a process for synthesising nucleic acid molecules of desired sequence and length in a simple and time-saving manner.

Dwg.0/6

Title Terms: SYNTHESIS; NUCLEIC; ACID; MOLECULAR; ATTACH; SINGLE; STRAND; MOLECULAR; DOUBLE; STRAND; START

Derwent Class: B04; D16

International Patent Class (Main): C12P-019/34

International Patent Class (Additional): C07H-021/00

File Segment: CPI

Manual Codes (CPI/A-N): B04-N04; D05-H18B

Chemical Fragment Codes (M1):

01 M423 M720 M903 N135 Q233 V753

Derwent WPI (Dialog® File 351): (c) 2006 The Thomson Corp. All rights reserved.

© 2006 Dialog, a Thomson business



⑮ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 196 33 427 A 1**

⑤① Int. Cl.⁶:
C 12 P 19/34
C 07 H 21/00

⑳ Aktenzeichen: 196 33 427.6
㉑ Anmeldetag: 20. 8. 96
㉒ Offenlegungstag: 19. 3. 98

DE 196 33 427 A 1

㉑ Anmelder:
Bernauer, Hubert S., Dr., 79249 Merzhausen, DE

㉒ Erfinder:
gleich Anmelder

⑤⑥ Entgegenhaltungen:
US 55 25 462
US 54 66 586
EP 04 97 272 A1
WO 93 19 202 A2

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤④ Verfahren zur Synthese von Nukleinsäuremolekülen mit zumindest teilweise vorbestimmter Nukleotidsequenz

⑤⑦ Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Synthese von Nukleinsäuremolekülen mit zumindest teilweise vorbestimmter Nukleotidsequenz. Insbesondere betrifft die Erfindung ein derartiges Verfahren, das rekursiv durchgeführt wird. Die Nukleinsäurekomponenten sind vorzugsweise synthetischen oder semisynthetischen Ursprungs. Das Prinzip des erfindungsgemäßen Verfahrens beruht darauf, daß an einem Nukleinsäure-Doppelstrangmolekül mit mindestens einem Überhang ein Nukleinsäure-Einzelstrangmolekül angelagert wird, der Einzelstrang durch eine Polymeraseaktivität aufgefüllt wird, der neu generierte Doppelstrang an einer vorbestimmten Stelle z. B. mit einem Typ II S Restriktionsenzym gespalten wird, wobei wiederum ein Überhang entsteht und die vorgenannten Verfahrensschritte ggf. so oft wiederholt werden, bis das gewünschte Produkt synthetisiert ist. Die Erfindung betrifft ferner einen Kit zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens.

DE 196 33 427 A 1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

BUNDESDRUCKEREI 01. 98 802 012/5

19/23

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Synthese von Nukleinsäuremolekülen mit zumindest teilweise vorbestimmter Nukleotidsequenz. Insbesondere betrifft die Erfindung ein derartiges Verfahren, das rekursiv durchgeführt wird. Die Nukleinsäurekomponenten sind vorzugsweise synthetischen oder semisynthetischen Ursprungs. Das Prinzip des erfindungsgemäßen Verfahrens beruht darauf, daß an einem Nukleinsäure-Doppelstrangmolekül, vorzugsweise mit mindestens einem Überhang, ein Nukleinsäure-Einzelstrangmolekül angelagert wird, der Einzelstrang durch eine Polymeraseaktivität aufgefüllt wird, der neu generierte Doppelstrang an einer vorbestimmten Stelle mit einer Restriktionsaktivität, z. B. mit einem Typ II S Restriktionsenzym gespalten wird, wobei vorzugsweise wiederum ein Überhang entsteht und die vorgenannten Verfahrensschritte ggf. so oft wiederholt werden, bis das gewünschte Produkt synthetisiert ist. Die Erfindung betrifft ferner einen Kit zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens.

Rekombinante Techniken zur Manipulation von Nukleinsäuren haben in den letzten zwanzig Jahren vielen wissenschaftlichen Disziplinen, aber auch der pharmazeutischen Industrie sowie der medizinischen Forschung einen enormen Auftrieb verliehen. In vielen Anwendungsbereichen ist es wünschenswert, ein Nukleinsäuremolekül mit genau definierter Sequenz auf möglichst einfache Weise mit lediglich geringem Zeit- und Kostenaufwand bereitzustellen. Die gegenwärtig am weitesten verbreiteten Verfahren zur Bereitstellung derartiger Nukleinsäuremoleküle beinhalten die Klonierung von DNA beispielsweise aus cDNA-Genbanken, gegebenenfalls gekoppelt mit anschließender Sequenzierung der isolierten cDNA. Andererseits kann DNA mit gewünschter Sequenz synthetisch, beispielsweise über das konventionelle Phosphoamidit-Verfahren, hergestellt werden.

Übliche Verfahren zur Bereitstellung gewünschter doppelsträngiger Nukleinsäuremoleküle werden nachfolgend am Beispiel der Bereitstellung von DNA-Molekülen erläutert. Interessierende DNA-Moleküle müssen, beispielsweise durch eine cDNA-Funktions- oder -Positionsklonierung, isoliert und in geeigneten Vektoren kloniert werden. Die Vermehrung der resultierenden Vektoren und damit der interessierenden DNA-Moleküle erfolgt in vivo. Dazu müssen die Vektoren in geeignete Wirtszellen, beispielsweise Bakterien oder Hefen, eingebracht werden. Zur weiteren Manipulation der DNA, beispielsweise für die Bereitstellung abgewandelter Konstrukte, die neue phänotypische Eigenschaften vermitteln, muß die DNA wieder aus den Wirtsorganismen isoliert werden. Erst dann steht sie wieder für Manipulationszwecke zur Verfügung. Zur weiteren Vermehrung muß sie wiederum in geeignete Wirtsorganismen eingebracht werden. Somit sind oft viele Verfahrensschritte und/oder umständliche Manipulationen notwendig, um eine gewünschte DNA zu erzeugen. Es ist auch leicht vorstellbar und dem Fachmann wohlbekannt, daß sich dieser Aufwand noch vervielfacht, sofern eine größere Anzahl an verschiedenartigen DNAs hergestellt werden soll.

Ein weiteres, im Stand der Technik bekanntes Verfahren für die in vitro-Synthese von doppelsträngiger DNA ist die PCR-Technik. Voraussetzung für eine derartige Herstellung ist die Verfügbarkeit geeigneter Matrizen-DNA. Die Subklonierung geeigneter DNA-Fragmente und die unter Umständen langwierige Einstellung der richtigen Reaktionsbedingungen für die PCR können die experimentellen Arbeiten beträchtlich verzögern.

Die vorstehend beschriebenen, im Stand der Technik bekannten Verfahren sind immer noch relativ zeit- und damit auch kostenaufwendig. Zudem sind sie, wie im Falle der cDNA-Klonierung, nicht immer ohne weiteres erfolgreich. Die synthetische Generierung von längeren Nukleinsäurefragmenten bereitet in der Praxis oft wesentliche Schwierigkeiten. Auch die Generierung von DNA durch PCR, obwohl sie die DNA-Rekombinationstechnik weit vorangetrieben hat, kann im Einzelfall nicht von Erfolg gekrönt sein oder auf Schwierigkeiten stoßen, wie vorstehend beschrieben wurde.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war daher, ein Verfahren bereitzustellen, das die Synthese von Nukleinsäuremolekülen gewünschter Sequenz und Länge auf einfache und zeitsparende Weise ermöglicht. Diese Aufgabe wird durch die in den Ansprüchen gekennzeichneten Ausführungsformen gelöst.

Die Erfindung betrifft somit ein Verfahren zur Synthese von Nukleinsäuremolekülen mit mindestens teilweise vorbestimmter Nukleotidsequenz, das die folgenden Schritte umfaßt:

- a) Bereitstellen eines Nukleinsäure-Doppelstrangmoleküls,
 - aa) das an mindestens einem Ende einen in seiner Nukleotidsequenz mindestens teilweise definierten Überhang aufweist oder in dem mindestens ein solcher Überhang erzeugt werden kann; oder
 - ab) das an mindestens einem Ende ein in seiner Nukleotidsequenz mindestens teilweise definiertes glattes Ende aufweist oder in dem mindestens ein solches Ende erzeugt werden kann;
- b) Anlagerung mindestens eines Nukleinsäure-Einzelstrangmoleküls an das Nukleinsäure-Doppelstrangmolekül, wobei das mindestens eine Einzelstrangmolekül sich an den Überhang, gegebenenfalls nach dessen Generierung, gemäß (aa) oder an das glatte Ende, gegebenenfalls nach dessen Generierung, gemäß (ab) anlagert und seinerseits einen Überhang erzeugt und wobei das Einzelstrangmolekül bei Anlagerung an ein glattes Ende, oder bei sukzessiver Anlagerung und Verknüpfung mehrerer Einzelstrangmoleküle vor der Auffüllreaktion an dem vom Ende des Doppelstrangmoleküls entfernten Ende maskiert ist;
- ba) Entfernung der Maskierung im Falle der sukzessiven Anlagerung mehrerer Einzelstrangmoleküle jeweils vor deren Verknüpfung;
- c) Auffüllen des zweiten, zum Einzelstrang in seiner Sequenz komplementären Nukleinsäurestranges durch eine Polymeraseaktivität;
- d) Spaltung des mindestens einen in Schritt (c) erzeugten Nukleinsäure-Doppelstrangmoleküls an einer vorbestimmten Stelle, wobei mindestens ein neuer Überhang oder ein glattes Ende entsteht und wobei eine gegebenenfalls noch vorhandene Maskierung abgespalten wird;
- e) gegebenenfalls ein- oder mehrmalige Wiederholung der Schritte (b), (c) und/oder (d), wobei in Schritt (b) jeweils geeignete Einzelstrangmoleküle eingesetzt werden;

- f) Legierung von 3'-Hydroxy- und 5'-Phosphat-Enden von endständigen Nukleotiden benachbarter, in das Nukleinsäure-Doppelstrangmolekül inkorporierter Nukleinsäure-Einzelstrangmoleküle, sofern es sich um glatte Enden handelt, nach Schritt (b), (c), (d) und/oder (e); und
g) Isolierung des so erzeugten Nukleinsäure-Doppelstrangmoleküls.

Das Prinzip des erfindungsgemäßen Verfahrens ist in Fig. 1 dargestellt. Weitere Ausführungsformen sind in den Fig. 2 bis 6 dargestellt.

Der Begriff "mindestens teilweise vorbestimmte(r) Nukleotidsequenz" impliziert, daß die Nukleinsäuresequenz entweder vollständig oder nur teilweise vorbestimmt sein kann. Im letzteren Falle kann die Sequenz beispielsweise Bereiche enthalten, die durch zufällige Mutagenese variabel gestaltet werden.

Der Begriff "Bereitstellen eines Nukleinsäure-Doppelstrangmoleküls" umfaßt jegliche Form des Bereitstellens, z. B. die Klonierung eines Gens mit anschließender Restriktionsspaltung und Isolierung eines Fragmentes mit z. B. einem oder zwei Überhängen, das als Ausgangsmaterial für das erfindungsgemäße Verfahren dient. In einer anderen Ausführungsform wird das Doppelstrangmolekül durch Aneinanderlagerung von zwei mindestens teilweise komplementären synthetischen Oligonukleotiden bereitgestellt, wobei durch die Aneinanderlagerung vorzugsweise mindestens ein Überhang entsteht.

Der Begriff "an mindestens einem Ende", wie erfindungsgemäß verwendet, bedeutet, daß die Synthese uni- oder bidirektional verlaufen kann.

Die "Anlagerung" der Nukleinsäure-Einzelstrangmoleküle erfolgt vorzugsweise durch Hybridisierung. Die erforderlichen Hybridisierungsbedingungen können, falls erforderlich, vom Fachmann ohne weiteres für jeden Schritt der Anlagerung eines neuen Einzelstranges aus seinen Fachkenntnissen heraus modifiziert werden.

Unter dem Begriff "in seiner Nukleotidsequenz mindestens teilweise definierte(r) Überhang" lassen sich die Ausführungsformen subsumieren, daß der Überhang in seiner Sequenz vollständig definiert ist und daß er nur in bestimmten Nukleotidpositionen definiert ist. Letztere Ausführungsform kommt beispielsweise dann zum Tragen, wenn die Sequenz, die durch das molekulare Werkzeug bei der Erzeugung der Überhänge erkannt/gespalten wird, in bestimmten oder unbestimmten Positionen das Vorhandensein verschiedener Nukleotide erlaubt.

Die im erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzten Nukleinsäure-Einzelstrangmoleküle haben i.d.R. eine Länge bis ca. 150 Nukleotiden. Bevorzugt ist eine Länge zwischen 15 und 130 Nukleotiden. Generell ist bei der Wahl der Länge der Einzelstrangmoleküle zu beachten, daß die Ausbeute intakter Oligonukleotide bei der chemischen Synthese von Einzelstrang-Vorläufermolekülen mit zunehmender Länge sinkt und zwar wegen fehlerhaften Einbaues von Nukleotiden. Es ist also ein Kompromiß einzugehen zwischen Länge der Oligonukleotide und deren Ausbeute. Einen Einfluß auf die Ausbeute an gewünschter Nukleinsäure mit dem erfindungsgemäßen Verfahren hat auch die Qualität der für die Synthese eingesetzten Einzelstrangmoleküle. Durch die Oligonukleotidreinigung mit Hilfe z. B. der HPLC sind die einzelnen Nukleinsäure-Einzelstrangmoleküle für weiterführende Synthesen intakt. Schließlich wird sich die Länge der für weiterführende Synthesen verwendeten Oligonukleotide nach dem Mengenbedarf für einen Syntheseschritt und der Ausbeute bei der chemischen Synthese orientieren.

Der Begriff "vorbestimmte Stelle", wie erfindungsgemäß vertieren.

Der Begriff "vorbestimmte Stelle" wie erfindungsgemäß verwendet, bedeutet entweder, daß diese Spaltung durch eine Primärsequenz oder, was erfindungsgemäß bevorzugt ist, durch ihre relative Positionierung zu einer Erkennungsstelle definiert ist.

Die Erzeugung eines mindestens teilweise definierten und vorzugsweise kohäsiven Endes für die weiterführende Synthese ist ein wesentliches Merkmal einer der beschriebenen Methoden.

In einer anderen Ausführungen der beschriebenen Methode ist auch die Erzeugung eines in seiner Sequenz mindestens teilweise definierten glatten Endes durchaus nützlich, sofern molekulare Werkzeuge eingesetzt werden, die eine effiziente Ligation eines Nukleinsäureeinzelstranges an einen Nukleinsäure-Doppelstrang ermöglichen (vgl. Fig. 4).

Die sukzessive Anlagerung und Verknüpfung mehrerer Einzelstrangmoleküle, wobei mehrere mindestens zwei bedeutet, vor der Auffüllreaktion ist in Fig. 6 dargestellt und in der Legende dazu erläutert.

Die Entfernung der Maskierung kann nach Standardverfahren erfolgen.

Welches (molekulare) Agens als Restriktionsaktivität im erfindungsgemäßen Verfahren letztlich Verwendung findet, ist nicht erfindungswesentlich. Wesentlich hingegen ist, daß die Erkennungssequenz auf der Nukleinsäure und die tatsächlich gespaltene Sequenz voneinander örtlich getrennt sind. Erfindungsgemäß wird nämlich in der Regel die Erkennungssequenz durch die Spaltung aus dem wachsenden Nukleinsäure-Doppelstrangmolekül entfernt. Die Restriktionsendonukleasen der Klasse II S besitzen Eigenschaften, die den Anforderungen an ein solches Agens entsprechen. Vertreter dieser Klasse, die ein freies, kohäsives 3'-Ende erzeugen, sind für das Reaktionsschema gemäß Fig. 2 geeignet, Vertreter der Restriktionsendonukleasen der Klasse II S, die ein überstehendes, kohäsives 5'-Ende erzeugen sind für das Reaktionsschema Fig. 3 geeignet.

Die Eigenschaften der Restriktionsaktivitäten, die im erfindungsgemäßen Verfahren einsetzbar sind, können wie folgt zusammengefaßt werden:

- das restringierende Agens kann vielfältiger Natur sein: dazu gehören alle Nukleinsäuren spezifisch spaltenden synthetischen Agentien wie synthetische Peptide, PNA (peptide nucleic acid) trippelhelikale DNA bildende Oligonukleotide, die für die spezifische Prozessierung des/der Nukleinsäure-Terminus/i im Sinne dieser Erfindung geeignet sind, wie auch natürlich vorkommende DNA-spaltende Enzyme. Der Fachmann ist in der Lage, für seine jeweiligen Zwecke geeignete Restriktionsaktivitäten einzusetzen;
- diese können beispielsweise Restriktionsendonukleasen des Typs II S sein;
- asymmetrische Erkennungssequenzen (Restriktionsendonukleasen der Klasse II S), wie auch symme-

trische Erkennungssequenzen sind dabei einsetzbar;

— wie bereits vorstehend erwähnt, dürfen die Spaltstellen, die durch die Restriktionsaktivität erzeugt werden, nicht innerhalb der spezifischen Erkennungssequenz liegen, sondern müssen 5' oder/und 3' distal davon lokalisiert sein;

— die Entfernung der Schnittstelle von der Erkennungssequenz muß genau und eindeutig definiert sein;

— um die Spezifität der Anlagerung des Nukleinsäure-Einzelstranges zu gewährleisten und eine effiziente Ligationsreaktion zu gewährleisten, sofern diese gewünscht ist, erzeugt das restringierende Agens vorzugsweise kohäsive Enden. Damit entfällt auch die vorstehend diskutierte Notwendigkeit der Maskierung der Einzelstränge, die z. B. an die glatten Enden angelagert werden.

Eine geeignete Auswahl an restringierenden Agentien kann der Fachmann der beigefügten Literaturliste entnehmen.

Die Durchführung des Schrittes (e) bzw. die Häufigkeit seiner Durchführung hängt letztendlich von der Länge des gewünschten Endproduktes als auch von der Stranglänge des zur Verfügung stehenden Ausgangsmaterials ab.

Die Vorteile, die die vorliegende Erfindung gegenüber dem Stand der Technik leistet, umfaßt unter anderem:

1. Verfügbarkeit: Sequenzen von Nukleinsäuren, beispielsweise von Genen sind, sofern die Nukleotidfolgen beispielsweise aus Datenbanken bekannt sind, jederzeit, überall und schnell (innerhalb von Tagen) verfügbar. In Kenntnis dieser Sequenzen sowie der erfindungsgemäßen Lehre kann der Fachmann jedes gewünschte Nukleotidmolekül synthetisieren.

2. Lagerung und Transport: Nukleinsäuremoleküle in der Größe von Genen müssen nicht mehr physikalisch in Kühlschränken unter hohem Energieverbrauch gelagert werden. Ihre Sequenzen können in EDV-Anlagen verwaltet, und bei Bedarf in einem Synthesegerät einfach synthetisiert werden. Somit entfällt auch der Transport über große Entfernungen. DNA-Sequenzen können per E-mail verschickt werden.

3. Manipulierbarkeit: Beliebige Nukleotid-, z. B. DNA-Sequenzen und Gensequenzen werden für das Erreichen bestimmter Eigenschaften, wie Stabilität gegenüber Hitze, pH-Änderungen oder Löslichkeit in bestimmten Lösungsmitteln wie auch der Optimierung oder Veränderung des biologischen Verhaltens ihrer Genprodukte in vitro mutiert. Die in vitro Mutagenese ist trotz vieler verschiedener Verfahren ein aufwendiges Unterfangen. Durch die Synthesemöglichkeit ist das Einfügen beliebig vieler Mutationen auch an weit auseinanderliegenden Sequenzpositionen möglich, da die Sequenz frei definierbar und vorherbestimmbar ist. Es können also beliebig viele Varianten erzeugt werden.

Die freie Synthetisierbarkeit der DNA-Sequenzen wird viele der heute üblichen Methoden zeitaufwendiger DNA-Manipulationen aus dem Labor an die Synthesemaschine verlagern, wodurch eine große Kosten-, und damit verbunden eine große Zeitersparnis resultiert. Das vom Fachmann durchzuführende Experiment besteht dann aus dem Design einer Nukleinsäuresequenz an einem Computereditor und der Überprüfung, ob die sich durch die Sequenzmanipulationen gewünschten Eigenschaften am biologischen Modell, in vitro oder in vivo einstellen. Das erfindungsgemäße Verfahren ist somit auch ein Beitrag zur Weiterentwicklung von Techniken der reversen Genetik.

In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens werden nicht in das Nukleinsäure-Doppelstrangmolekül inkorporierte Nukleinsäure-Einzelstrangmoleküle nach Schritt (b), (ba), (c) und/oder Schritt (d) abgetrennt. Die Abtrennung der nicht inkorporierten Nukleinsäure-Einzelstrangmoleküle ist zwar bevorzugt, aber nicht unbedingt notwendig und kann vom Fachmann nach Standardverfahren, z. B. durch säulenchromatographische Verfahren bewerkstelligt werden. Die Konzentration an freien Nukleotidtriphosphaten könnte insbesondere für die Gesamtausbeute an gewünschter Nukleinsäure limitierend werden, verbrauchte Nukleotide die Synthese und Ligationsreaktion stören, die z. B. im Falle der Generierung von glatten Enden bzw. der Anlagerung von Nukleinsäure-Einzelsträngen an glatte Enden und nachfolgender Erzeugung des komplementären Stranges bei der Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens notwendig ist, wie vorstehend beschrieben wurde. Eine hohe Konzentration verschiedener Einzelstrang-DNAs erhöht das Risiko unerwünschter Nebenprodukte. Praktisch ist es deshalb von Vorteil, wenn jeder einzelne Syntheseschritt unter optimalen Bedingungen ablaufen kann. Somit empfiehlt sich eine Abtrennung der nicht benötigten Einzelstränge jeweils vor dem nächsten Syntheseschritt, beispielsweise in einer matrixgekoppelten Reaktion, nach deren Ablauf verbrauchte Nukleotide und überschüssige Einzelstrang-Nukleinsäuren eluiert werden.

Die Abtrennung kann somit selbstverständlich auch nach oder während der Durchführung des Schrittes (e) erfolgen.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens werden die Hydroxy und Phosphat-Enden von endständigen Nukleotiden benachbarter, in das Nukleinsäure-Doppelstrangmolekül inkorporierter Nukleinsäure-Einzelstrangmoleküle durch eine Ligaseaktivität miteinander verknüpft, sofern das Einzelstrangmolekül bei seiner Anlagerung an das Doppelstrangmolekül an einen Überhang angelagert wurde.

Die vorstehend beschriebene Ligation kann beispielsweise vor, gleichzeitig mit oder nach Schritt (d) erfolgen. In einer anderen Ausführungsform kann sie nach oder während des Schrittes (e) erfolgen. Ein Beispiel für die Ligation nach Schritt (e) liefert der Fall, daß Bakterien, z. B. E. coli, mit dem nicht ligierten Syntheseprodukt transformiert werden und die Ligation durch endogene Ligasen vorgenommen wird. So ist bekannt, daß mit zunehmender Größe der komplementären Überlappung kohäsiver Enden eine Transformation beispielsweise von E. coli mit geeigneter DNA unter Ausnutzung der endogenen Ligaseaktivität zur Zikularisierung möglich ist. Dabei werden Lücken und überstehende Einzelstrang-DNAs durchaus toleriert, da Reparaturmechanismen die Integrität des zirkulären Doppelstranges wieder herstellen. Einzelstrangbereiche werden aufgefüllt und

repariert, wenn zumindest ein Phosphodiesterückrat intakt ist. Vorzugsweise wird eine Ligation dann vorgenommen, wenn die Überhänge nur wenige Nukleotide lang sind. Im Falle längerer Überhänge ist denkbar, daß zwischen den endständigen Nukleotiden des Einzel- und des Doppelstranges Lücken auftreten, die vor einer Ligrationsreaktion beispielsweise durch eine Polymeraseaktivität geschlossen werden. Da die bislang bekannten Restriktionsenzyme zumeist nur relativ kurze kohäsive Enden erzeugen, ist auch ein c und G bzw. A und T "tailing" mit terminaler Transferase denkbar, das lange Überlappungsbereiche erzeugt, die ohne "in vitro" Ligation direkt transformiert werden können.

Schließlich kann das Syntheseprodukt auch nach Schritt (g) einer Ligation zugeführt werden.

In einer anderen bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist die Nukleinsäure DNA.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist die Nukleinsäure RNA.

Von dem erfindungsgemäßen Verfahren umfaßt ist auch die Generierung von DNA/RNA-Hybriden.

Die Erfindung betrifft in einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ein Verfahren, wobei mindestens einer der Überhänge ein 3'-Überhang ist. Diese Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist in Fig. 2 näher erläutert.

Die Erfindung betrifft in einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ein Verfahren, wobei mindestens einer der Überhänge ein 5'-Überhang ist.

Besonders bevorzugt ist dabei ein Verfahren, wobei der Einzelstrang an dem vom Doppelstrang nach Anlage- rung entfernten Ende eine Haarnadelschleife ausbildet, die als Primer für die Polymeraseaktivität dient. Diese Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist durch Fig. 3 illustriert.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist das Nukleinsäure-Einzelstrangmolekül an seinem 5'-Ende maskiert.

Das 5'-Ende eines anzulagernden Nukleinsäure-Einzelstrangmoleküles kann durch geeignete, modifizierte Nukleotide maskiert sein, damit nicht durch eine unerwünschte Ligasenebenreaktion die 5'- und 3'-Enden der Nukleinsäure-Einzelstrangmoleküle miteinander verbunden werden und gegebenenfalls Konkatemere gebildet werden. Dieses unerwünschte Reaktionsprodukt, das für eine optimale Ausbeute des Verfahrens der erfindungs- gemäßen Lehre unterbunden bzw. vermieden werden sollte, kann beispielsweise unterbunden werden durch:

- ein 5'-dephosphoryliertes Ende des Nukleinsäure-Einzelstrangmoleküls; sowie
- Einbau von 5'-modifiziertem Nukleotid (z. B. Biotin-dNTP, Digoxigenin-dNTP).

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgt die Maskierung durch den Einbau mindestens eines 5'-modifizierten Nukleotids.

Die Erfindung betrifft in einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ein Verfahren, wobei die Spaltung an einer vorbestimmten Stelle in Schritt (d) durch eine sequenzspezifisch spaltende trippelhelikale DNA erfolgt.

Eine trippelhelikale DNA wird z. B. dann gebildet, wenn sich eine Einzelstrang-DNA, an deren Ende ein Schwermetall (SM) gekoppelt ist, an einen DNA-Doppelstrang anlagert und, sofern die Sequenzbedingungen geeignet sind, eine trippelhelikale Struktur mit einem DNA-Doppelstrang ausbildet. Der Nukleinsäure-Doppel- strang wird von dem Schwermetall an einer definierten Position gespalten.

Darüberhinaus kann erfindungsgemäß jede spezifische physikalische, chemische und enzymatische Nuklein- säurespaltung eingesetzt werden, welche für die Anlagerung eines Nukleinsäure-Einzelstrangmoleküles zur nachfolgenden Ligation mit dem Nukleinsäure-Doppelstrangmolekül förderlich ist. Weitere Beispiele hierfür sind methodische Ansätze basierend auf designaten Peptiden oder PNA (peptide nucleic acid). Eine Übersicht über die vorgenannten Moleküle und Beispiele für deren Einsatzmöglichkeiten kann der Fachmann der nachste- henden Literaturliste entnehmen.

Eine andere bevorzugte Ausführungsform der Erfindung betrifft ein Verfahren, wobei die Spaltung an einer vorbestimmten Stelle in Schritt (d) durch eine Typ II S Restriktionsendonuklease erfolgt. Typ oder Klasse II S Enzyme besitzen eine asymmetrische, also nichtpalindromische Erkennungssequenz. Die Spaltstellen liegen entweder 5'- oder 3'-distal zur Erkennungssequenz. Es werden entweder 5'- (z. B. BspMI) oder 3'- (z. B. RleAI) überstehende Enden oder glatte Enden (z. B. BsmFI) erzeugt.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist die Typ II S Restrik- tionsendonuklease das Rle AI-Enzym aus *Rhizobium leguminosarum* (Vesely Z., Müller A., Schmitz G., Kaluza K., Jarsch M., Kessler c (1990) RleAI: a novel class-IIIS restriction endonuclease from *Rhizobium leguminosarum* recognizing 5'-CCCACA(N12/9)-3', Gene 95: 129—131).

In einer anderen bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist/sind das Nukleinsäure-Doppelstrangmolekül und/oder die Nukleinsäure-Einzelstrangmoleküle synthetischen oder semisyntheti- schen Ursprungs.

Besonders bevorzugt für die Synthese ist der Einsatz synthetischer Einzelstrangmoleküle.

Semisynthetische Moleküle sind dadurch herstellbar, daß Nukleinsäurefragmente aus "in vivo" (Bakterien, Hefe) amplifizierter DNA (dsDNA, ssDNA) oder RNA an einer oder mehreren intermediären Schritte der erfindungsgemäßen Synthese an definierten Stellen durch Ligationseaktionen eingebaut werden. Diese Strategie kann im Einzelfall Kosten beträchtlich reduzieren helfen. Beispielsweise kann das als Startermolekül Nukleinsäure-Doppelstrangmolekül ebenfalls ein "in vivo" erzeugtes DNA-Molekül sein, an das durch rekursive DNA-Synthese beliebige DNA-Sequenzen angehängt werden.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird nach Schritt (g) folgender Schritt durchgeführt:

h) Denaturierung des Nukleinsäure-Doppelstrangmoleküls und Isolierung der Nukleinsäure-Einzelstrangmoleküle.

Diese Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist dazu geeignet, Nukleinsäure-Einzelstrangmoleküle beliebiger Zusammensetzung herzustellen. In diesem Zusammenhang besonders zu erwähnen ist die Möglichkeit, derartige RNA-Moleküle bereitzustellen.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist die Synthese zumindest teilweise automatisiert.

So kann beispielsweise in einem Nukleinsäure (Gen-)syntheseautomaten für Nukleinsäure-Doppelstränge aus Nukleinsäure-Einzelsträngen eine Batterie von automatisierten chemischen Oligonukleotidsynthesen (eine bereits in großem Ausmaße praktizierte Technologie) den Rohstoff für die Synthese von biologisch aktiven, doppelsträngigen DNA-Molekülen (z. B. ganzen Genen) darstellen. Diese werden aus den chemisch synthetisierten Oligonukleotiden in einem ebenfalls automatisierten Verfahren hergestellt.

Dabei sind in einer Synthesekammer die zu verlängernden Doppelstrangnukleinsäuren an der Synthesematrix gebunden. In dieser Synthesekammer laufen in einer cyclischen Reaktionsfolge immer wieder die gleichen Schritte ab (Anlagerung des Nukleinsäure-Einzelstranges, Ligation, matizenabhängige Auffüllreaktion, Spaltung zur Erzeugung eines freien Endes des neusynthetisierten Nukleinsäure-Doppelstrangmoleküls). Die Reaktionsnebenprodukte der vorhergehenden Reaktion werden vor Beginn einer neuen Reaktion aus der Synthesekammer ausgewaschen. Der um ein Oligonukleotid verlängerte Doppelstrang bleibt an die Synthesematrix gebunden. Bei jedem Syntheseschritt wird eine Nukleinsäure mit einer anderen Sequenzfolge eingebaut, so daß schließlich eine doppelsträngige Nukleinsäure mit der gewünschten Nukleotidsequenz entsteht.

Die Erfindung betrifft in einer besonders bevorzugten Ausführungsform ein Verfahren, wobei die Synthese matrixgebunden durchgeführt wird.

Alle Trägermaterialien, an die sich eine Nukleinsäure binden läßt und deren Eigenschaften mit der angestrebten rekursiven Nukleinsäure-Synthese kompatibel ist, kommen als Synthesematrix in Frage, z. B. streptavidinbemannte Oberflächen, wobei das als Startermolekül eingesetzte Nukleinsäure-Doppelstrangmolekül über ein eingebautes biotinyliertes Nukleotid an die Synthesematrix gekoppelt wird. Weitere Beispiele sind Nylonoberflächen, an die polydT-haltige Sequenzen durch UV-Bestrahlung gekoppelt werden und tosylaktivierte Oberflächen, und die Bindung über "Aminolinks".

In einer anderen bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist die Matrix eine Nylonoberfläche.

Schließlich betrifft die Erfindung einen Kit, mindestens enthaltend

- a) eine Ligase sowie einen Ligasepuffer;
- b) eine Polymerase sowie einen für die erfindungsgemäße Synthese geeigneten Polymerasepuffer;
- c) gegebenenfalls ein Typ II S-Restriktionsenzym sowie einen geeigneten Restriktionspuffer;
- d) gegebenenfalls einen Waschpuffer zur Elution von Reaktionsnebenprodukten und nicht in das Produkt der erfindungsgemäßen Synthese eingebautem Material; und
- e) gegebenenfalls eine Synthesematrix mit einem gegebenenfalls bereits daran gebundenen Nukleinsäure-Doppelstrangmolekül als Startermolekül.

Aufgrund der Lehre der vorliegenden Erfindung sowie aufgrund des allgemeinen Fachwissens in diesem technischen Gebiet ist dem Hersteller des erfindungsgemäßen Kits bekannt, wie er die einzelnen Komponenten des Kits, z. B. die Puffer, herstellt und formuliert. Gegebenenfalls kann der erfindungsgemäße Kit auch ein nicht an eine Matrix gebundenes Startermolekül und/oder einen Satz geeigneter Einzelstrangmoleküle enthalten.

Die Figuren zeigen:

Fig. 1 Rekursive Nukleinsäuresynthese. Das prinzipielle Standardschema für die rekursive Nukleinsäure-Synthese "in vitro" benötigt mehrere molekulare Werkzeuge, mit denen die einzelnen Reaktionsschritte durchgeführt werden können. (1) Startermolekül, das frei in Lösung vorliegen kann, aber idealerweise an eine Trägermatrix gekoppelt ist. (2) erkenntungssequenzabhängige Restriktionsaktivität (■) oder eine das 3'-Ende des neusynthetisierten Nukleinsäure-Doppelstranges spezifisch prozessierende Aktivität, mit spezifischen Spaltstellen für den Nukleinsäure-Doppelstrang. (3) Nukleinsäure-Einzelstrangmoleküle (Sequeme) (---) mit Erkennungsstelle für die Restriktionsaktivität, falls notwendig (4) Ligaseaktivität (5) templateabhängige Nukleinsäure-Polymeraseaktivität. Je nach der erfindungsgemäßen Ausführung können Varianten des prinzipiellen Standardschemas auftauchen, bei dem ein Reaktionsschritt entbehrlich ist oder es kann ein Reaktionsschritt zusätzlich eingeführt werden.

Fig. 2 Rekursive Nukleinsäuresynthese mit 3'-überstehendem Terminus I. Eine doppelsträngige Starternukleinsäure wird bereitgestellt. Durch eine spezifische Nukleinsäure-Spaltungsreaktion (1.) wird an einem Nukleinsäure-Doppelstrang ein 3'-überstehendes Nukleinsäure-Einzelstrangende erzeugt. (2.) und (3.) Ein synthetischer Nukleinsäure-Einzelstrang lagert sich spezifisch an das komplementäre, überstehende Nukleinsäure-Einzelstrangende an. Eine Nukleinsäure-Ligasereaktion verbindet das 3'-Ende des Nukleinsäure-Einzelstranges mit dem 5'-Ende des Nukleinsäure-Doppelstranges. (3.) In einer Polymerisationsreaktion wird matizenabhängig der Einzelstrang, ausgehend von dem 3'-Ende des vorhergehenden Nukleinsäure-Doppelstranges, zu einem Doppelstrang aufgefüllt und der Nukleinsäure-Doppelstrang dadurch verlängert. (4.) Eine Restriktionsaktivität sorgt für ein neues freies 3'-Ende, das für einen weiteren Reaktionszyklus zur Verfügung steht. (5.) Der n+1. Zyklus beginnt wieder mit der Anlagerung eines neuen synthetischen Einzelstranges, gefolgt von einer einer Ligationsreaktion und einer Polymerisationsreaktion (6) und wiederholt sich m-mal mit verschiedenen Nukleinsäure-Einzelstrangmolekülen (Sequeme) bis zum Ende der Synthese (n+m). Ligation und Polymerisation können

zeitlich getrennt sein und vertauschte Reihenfolge aufweisen.

Fig. 3 Rekursive Nukleinsäuresynthese mit 5'-überstehendem NS-Ende I Eine doppelsträngige Starternukleinsäure wird bereitgestellt. Durch eine spezifische Spaltungsreaktion wird (1.) an einem Nukleinsäuredoppelstrang ein 5'-überstehendes kohäsives Nukleinsäure-Einzelstrangende erzeugt. Ein synthetischer Nukleinsäure-Einzelstrang lagert sich an das komplementäre, überstehende Ende spezifisch an (2. und 3.). Eine Ligasereaktion verbindet das 3'-Ende des Doppelstranges mit dem 5'-Ende des angelagerten Nukleinsäure-Einzelstrangmoleküls (4.) In einer Polymerisationsreaktion wird, ausgehend vom 3'-Ende der 3'-terminalen Haarnadelstruktur, matrizenabhängig das synthetische Nukleinsäure-Einzelstrangmolekül weitgehendst zu einem Nukleinsäure-Doppelstrang aufgefüllt. (5.) Eine Restriktionsaktivität sorgt für ein neues freies 5'-Ende, das für einen weiteren Reaktionszyklus zur Verfügung steht. (6.) Der $n+1$. Zyklus beginnt wieder mit der Anlagerung eines neuen synthetischen Einzelstrang, gefolgt von einer Polymerisationsreaktion und einer Ligationsreaktion und wiederholt sich m mal mit verschiedenen Nukleinsäure-Einzelstrangmolekülen (Sequemere) bis zum Ende der Synthese ($n+m$). Ligation und Polymerisation können zeitlich getrennt sein und vertauschte Reihenfolge aufweisen.

Fig. 4 Rekursive Nukleinsäuresynthese mit glattem Nukleinsäure-Ende I Eine doppelsträngige Starternukleinsäure mit glatten Enden ("blunt end") (1.) wird bereitgestellt. Durch eine spezifische Spaltungsreaktion wird (2.) an einem Nukleinsäuredoppelstrang ein glattes Ende erzeugt. (2. und 3.) Ein synthetischer Nukleinsäure-Einzelstrang wird an das 5'-Ende des glatten Endes mit einer geeigneten Ligaseaktivität ligiert. Eine matrizenabhängige Polymerisationsreaktion wird an dem freien 3'-Ende des Doppelstranges initiiert und der Einzelstrang zu einem Doppelstrang aufgefüllt. (4.) Eine Nukleinsäure-spezifische Restriktionsaktivität sorgt für ein neues, definiertes freies 3'-Ende, das für einen weiteren Reaktionszyklus zur Verfügung steht. (5.) Der $n+1$. Zyklus beginnt wieder mit der Anlagerung eines neuen synthetischen Einzelstranges, gefolgt von einer Ligationsreaktion und einer Polymerisationsreaktion und wiederholt sich m -mal mit verschiedenen Oligonukleotiden bis zum Ende der Synthese ($n+m$). Ligation und Polymerisation können zeitlich getrennt sein.

Fig. 5 Rekursive Nukleinsäuresynthese mit glattem Nukleinsäure-Ende II Eine doppelsträngige Starternukleinsäure mit glatten Enden (1.) wird bereitgestellt. Ein synthetischer Nukleinsäure-Einzelstrang ($n+1$) wird an das 5'-Ende des mit einer geeigneten Ligaseaktivität ligiert (2.). Eine matrizenabhängige Polymerisationsreaktion wird an dem freien 3'-Ende des Doppelstranges initiiert und der Einzelstrang zu einem Doppelstrang mit einem glatten Ende aufgefüllt. (3.) Der $n+2$. Zyklus beginnt wieder mit der Anlagerung eines neuen synthetischen Einzelstrangs (4.), gefolgt von einer Nukleinsäure-Polymerisationsreaktion und einer Ligationsreaktion und wiederholt sich m -mal mit verschiedenen Nukleinsäure-Einzelstrangmolekülen bis zum Ende der Synthese ($n+m$). Ligation und Polymerisation können zeitlich getrennt sein.

Fig. 6 Rekursive Nukleinsäuresynthese mit glattem Nukleinsäure-Ende II Eine doppelsträngige Starternukleinsäure mit glatten Enden (1.) wird bereitgestellt. Als Sonderfall der vorstehend dargestellten Ausführungsformen ist hier die Ligation mehrerer Einzelstrangoligonukleotide zu einer Kette gezeigt, wobei die Auffüllreaktion durch eine Polymerase erst nach der Ligation mehrerer einzelsträngiger Teilsequenzen erfolgt. Bei diesem Reaktionstyp ist aber die Konkatemerbildung zu unterdrücken und dies setzt eine Maskierung der Nukleinsäure-Einzelstrangmoleküle voraus. Durch eine geeignete Prozessierungsreaktion muß aber diese Maskierung vor dem Einbau eines neuen Nukleinsäure-Einzelstrangmoleküls wieder spezifisch entfernt werden.

Beispiel zur Erfindung

Zusammenfassung

Die rekursive DNAa-Synthes "in vitro" kann für Manipulation von DNA-Sequenzen "in vitro" eingesetzt werden. Zum einen können Genmutationen, wie Deletionsmutagenesen, auch mehrere Deletionen in einem Gen gleichzeitig, Genfusionen unter Erzeugung neuer Eigenschaften, Insertionsmutagenesen, Substitutionsmutagenesen und auch Sequenzinversionen durchgeführt werden. Desweiteren lassen sich eine bis beliebig viele Punktmutationen in eine Sequenz einführen. Alle DNA-Sequenzen können ohne Zwischenklonierungsschritte in parallelen Synthesen direkt erzeugt werden.

Die durch die Sequenzmanipulationen resultierenden funktionalen Veränderungen der biologischen Aktivität "in vivo" können sich zum einen auf der Proteinebene auswirken, sofern die codierenden Sequenzen in funktionale Proteine translatiert werden können. Die Methode kann somit zur Umsetzung von Überlegungen bei Enzylobzw. Proteindesign eingesetzt werden.

Zum anderen aber ist es möglich die DNA-Sequenzen regulatorischer cis-Elemente zu manipulieren, dadurch die Bindungsaktivität von Transaktivatoren und Suppressoren zu verändern, deren Verhalten zu untersuchen oder gar ganz neue Kombinationen von cis-Elementen zu schaffen. Weiterhin könnte auch die Aktivität von RNA-Molekülen manipuliert werden (z. B. Ribozyme), sofern die manipulierte DNA transkribiert wird.

Das folgende Beispiel für die Anwendung der rekursiven DNA-"in vitro"-Synthesemethode ist die Manipulation von DNA-Sequenzen zur Analyse der Bindungsaktivität eines transaktiven Regulatorproteins an einer bakteriellen Promotorregion. Durch in "in vitro" Mutagenese der Bindungsstellen werden die Auswirkungen auf das DNA-bindende Protein untersucht. Die DNA-Wildtypsequenz und die Mutanten des cis-aktiven Elementes sind in der Fig. 7 dargestellt, die Sequenzmanipulationen sind im Text erläutert. Ziel der Versuche war es die Funktionalität der Bindung des Regulators in einem anderen Sequenzkontext "in vitro" und eventuell auch "in vivo" untersuchen zu können.

Einleitung

Auf einem SauIII A-DNA-Fragment im Bereich eines bakteriellen Promotors finden sich palindromische

Sequenzabschnitte, deren Struktur starke Ähnlichkeit mit Sequenzen besitzen, die auch in anderen Systemen an der transkriptionellen Regulation beteiligt sind. Die transkriptionelle Aktivität des im 5'-Sequenzbereich des 6-HDNO-Gens befindlichen σ^{70} -ähnlichen Promotors, auf dem cis-aktive Elemente liegen, wurde von Mauch et al (1990) "in vivo" im hererologen E. coli System detailliert untersucht. Die Klonierung dieses DNA-Fragments, da in den meisten DNA-Bindungsstudien dieser Arbeit Verwendung fand, wird im folgenden als WT-6-HDNO-Promotorfragment bezeichnet (Fig. 7A (1–3)).

Die Inkubation von Rohextrakten aus *Arthrobacter nicotinovorans* Zellen (10–40 µg Gesamtprotein) mit einem radioaktiv markierten 6-HDNO-Gens bei Anwesenheit eines Kompetitors (i.d.R. pIdC), aus dem Promotorbereich, zeigt nach der Trennung der Bestandteile dieses Inkubationsansatzes im elektrischen Feld eines nativen PAA-Gels eine deutliche Retention des DNA-Fragments gegenüber einem Kontrollansatz ohne Zugabe von Rohextraktprotein.

Der zur Identifikation der NicR1-Bindeaktivität herangezogene experimentelle Ansatz wird als Gelretentionsanalyse bezeichnet. Mit Hilfe dieser Methode kann das kinetische und funktionale Verhalten von DNA-Bindungsproteinen in Abhängigkeit von verschiedenen Parametern "in vitro" qualitativ und quantitativ untersucht werden. Außerdem kann man unter bestimmten Voraussetzungen auch Aussagen zur Struktur des DNA/Protein-Komplexes machen.

Unter Verwendung von Rohextrakten kann man in der Regel im Gelretentionsexperiment eine dominante, retardierte Bande erkennen. Eine zweite Bande ist manchmal ebenfalls erkennbar. Diese DNA-Bindungsaktivität konnte durch große Mengen von unmarkierter, unspezifischer Kompetitor-DNA nicht supprimiert werden, wohl aber durch unmarkiertes Bindefragment in sehr geringen Mengen. Es wurde deshalb angenommen, daß diese DNA-Bindeaktivität spezifisch ist und mit der transkriptionellen Regulation des Nikotinregulon in Zusammenhang steht. Sie wurde mit dem Kürzel NicR1 (nicotine regulator 1) bezeichnet (Mauch et al 1990, Bernauer et al, 1992).

Das Verhalten der NicR1-Bindeaktivität im Gelretentionsexperiment wurde in dieser Arbeit analysiert um Aussagen über den Ort, die Spezifität, Kinetik und Stöchiometrie der Bindungsreaktion treffen zu können und die Reaktion der DNA-Bindungsfunktion auf Manipulationen an dem WT-6-HDNO-Promotorfragment und auf potentielle Effektorsubstanzen zu untersuchen.

Diese Versuche sollten darüber Aufschluß geben, welche molekularen Mechanismen für die Regulation des 6-HDNO-Gens verantwortlich sein könnten. Außerdem wurden die Anzuchtbedingungen und der Induktionsstatus der *Arthrobacter nicotinovorans* Zellen variiert, aus denen schließlich Rohextrakt zur Analyse im Gelretentionsexperiment hergestellt wurde. Diese Experimente sollten Aufschluß darüber geben ob sich das Bindungsverhalten von NicR1 verändert oder die Anwesenheit zusätzlicher Faktoren in Abhängigkeit von einem der Versuchsparameter nachzuweisen sind. Der zu den Protein/DNA-Bindungsversuchen verwendete Reaktionsstandardpuffer lehnt sich an den von Garner und Revzin (1981) verwendeten Reaktionspuffer an.

Die NicR1-Bindeaktivität ist durch Ammoniumsulfatfraktionierung anreicherbar. Die Anreicherung der NicR1-Bindungsaktivität war die Voraussetzung für Versuche zur Analyse des Bindungsverhaltens von NicR1 bei gleichzeitiger Bindung von beiden palindromischen Sequenzen, die auf dem WT-6-HDNO-Promotorfragment zu finden sind.

Das WT-Promotorfragment

Das WT-6-HDNO-Promotorfragment aus dem 5'-Kontrollbereich des 6-HDNO-Gen besitzt einige sehr interessante Sequenzmerkmale (s. Fig. 7). Es ist von ausgedehnten invertierten Sequenzwiederholungen (IR) und anderen auffälligen Sequenzmotiven geprägt. Charakteristische Sequenzarrangements innerhalb der 6-HDNO-Gen-Promoterregion sind in Fig. 7 gezeigt. Diese zeigt zwei invertierte Wiederholungen, IR1 und IR2, welche extensive Homologien untereinander haben (Fig. 7). Die rechte palindromische Halbseite von IR2 wiederholt sich im 5'-Bereich noch einmal. Solche Palindrome sind strukturelle Merkmale, die man in vielen bakteriellen cis-aktiven Regulatorregionen findet.

IR1 und IR2 sind durch eine 50 bp interpalindromische Sequenz voneinander getrennt. Die palindromischen Halbseiten von IR1 sind über 17 bp zueinander homolog, die von IR2 über 9 bp. Das Palindrom von IR1 erreicht eine um zwölf Basenpaare größere Ausdehnung, zeigt aber in diesem Bereich zwei Insertionen von je zwei und einem Basenpaar (AT, A). Zehn von zwölf Basenpaaren von IR1 in der 5'-Hälfte und 9 von 12 Basenpaaren in der 3'-Hälfte der Sequenz sind zu IR2 homolog (Fig. 7A, Sequenzen von IR1 und IR2). Diese sequenzspezifischen Merkmale könnten strukturelle und funktionale Bedeutung bei der Bindung des "in trans"-bindungsaktiven Proteins NicR1 und einer σ^{70} -ähnlichen RNA-Polymerase besitzen. IR1 repräsentiert eine nahezu perfekte σ^{70} -ähnlichen Promotorsequenz, mit einer bemerkenswerten Modifikation. Die -10-Region unterscheidet sich von der Konsensussequenz TAT AAT durch die Insertion eines C wobei die Sequenz TATCAAT entsteht. In der Sequenz von IR2 findet man eine -30-Region aber keine Ähnlichkeit zu der bekannten -10-Region einer σ^{70} -ähnlichen Promotorsequenz. Der Abstand der -10 und -30-Region entspricht mit 16 bp dem σ^{70} -Ideal von 17. Integriert in die Sequenz von IR2 ist die -35-Region eines σ^{70} -ähnlichen Promotors, eine konsensusähnliche -10-Region fehlt. Einige andere Sequenzmerkmale könnten auch die Aktivität weiterer am 5'-Sequenzbereich des 6-HDNO-Gens transaktiver regulatorischer Elemente widerspiegeln. Innerhalb der Palindrome IR1 und IR2 befinden sich drei NlaI-(CATG)-Erkennungspalindrome an homologer Position. Interessant ist, daß sich hinter der linken palindromischen Halbseite von IR2, an nichthomologer Position, ebenfalls eine solche Schnittstelle befindet. Es stellt sich die Frage von Zufall oder Notwendigkeit einer solchen Struktur. Außerhalb der palindromischen Sequenzen von IR1 und IR2 befinden sich ebenfalls auffallende Sequenzmotive. GC- und AT-reiche Sequenzen sind alternierend angeordnet. Ein interessantes Sequenzmerkmal dieser Domäne ist die Gegenwart CG reicher Sequenzabschnitte, welche von einem AT-reichen Sequenzabschnitte in der 6-HDNO-

5'-Sequenz unterbrochen werden. Die GC-Sequenzblöcke sind oberhalb der 5'-Region des σ^{70} -ähnlichen Promotors lokalisiert. Eine detaillierte Basennachbarschaftsanalyse nach dem in Ebbole und Zalkin (1989) beschriebenen Algorithmus zeigte, daß diese Sequenz in hohem Maße nichtstatistisch ist. Um dies zu zeigen wurde eigens ein Computerprogramm in "Pascal" geschrieben. Während die Sequenzen innerhalb der palindromischen Bereiche aus ziemlich regelmäßig kurzen GC- und AT-Bereichen mit sehr ausgewogenem GC-Gehalt bestehen, finden sich 5' zu den Palindromen größere Sequenzabschnitte mit sehr unausgewogenem GC-Gehalt (Fig. 7). Zunächst steigt der GC-Gehalt von 5' außerhalb des Palindroms IR2 kommend an, es wird zunächst ein GC-Maximum, dann ein GC-Minimum durchlaufen (Fig. 7A). Die Situation wiederholt sich vor dem Palindrom IR1. Alternierende GC- und AT-reiche Sequenzabschnitte werden mit strukturellen Eigenschaften der Proteinbindung in Zusammenhang gebracht. Die AT-reichen Positionen drehen sich mit ihrer kleinen DNA-Furche in das Protein, die GC-reichen Sequenzblöcke zeigen nach außen. GC-reiche Promotoren, welche mit den bekannten σ^{70} -ähnlichen Promotoren keine Sequenzähnlichkeit mehr besitzen, finden sich in *Straptomyces* Spezies.

Klonierung des WT-6-HDNO-Promotorfragments und der mutanten Sequenzen

Als Startermolekül (s. Fig. 7AA(0)) für die rekursive DNA-Synthese wurde das Plasmid pUC19 (Yanisch-Perron et al, 1985) mit BamHI und KpnI doppelverdaut und über ein Agarosegel gereinigt. KpnI hat die Erkennungssequenz 5'-GGTAC'3'. an das 3'-überstehende Kpn-Ende wurde ein Oligonukleotid komplementärer Sequenz in Anwesenheit einer T4-Ligase, T4-DNA-Polymerase und 0,2 mM dMTP unter Standardbedingungen (Sambrook et al., (1989) angelagert, ligiert und zum Doppelstrang aufgefüllt. Das Oligonukleotid besitzt am 5'-Ende die Erkennungssequenz der Restriktionsendonuklease RleAI plus ein paar zusätzliche Basen (s. Fig. 7A(1)). Das nun doppelsträngige DNA-Molekül (aufgefülltes, überstehendes synthetisches Oligonukleotid) wurde mit einer Anreicherungsfraktion der Restriktionsendonuklease RleAI aus *Rhizobium leguminosarum* restrigiert (jeweils Fig. 7(2') und (3')). Die Reaktionsbedingungen wurden aus Veseley et al. (1990) entnommen. Dieses Enzym erzeugt 3'-überstehende Enden außerhalb seiner asymmetrischen Bindungsstelle. Diese Spezifität ist bislang einzigartig und läßt die wiederholte Anlagerung eines Oligonukleotides und das Priming für eine DNA-Polymerisation zu. Das kurze DNA-Fragment mit der RleAI-Erkennungssequenz wurde vom Plasmid über ein Agarosegel weggereinigt. An das bei der Restriktionsreaktion entstehende 3'-überstehende Ende wurde erneut ein zu diesem Ende komplementäres Oligonukleotid (Fig. 7A(2)) angelagert und aufgefüllt wie oben erwähnt (s. auch Fig. 1 und 2). Die gleiche Reaktion wurde mit dem Oligonukleotid (Fig. 7A(3)) und den Varianten Fig. 7b-1 bis B-7 durchgeführt. Durch die Verwendung von synthetischen Oligonukleotiden konnten parallel sieben Sequenzvarianten und die Wildtypsequenz erzeugt werden. Nach der Reaktionsfolge Fig. 7A (3) wurden die neu entstandenen DNAs mit BamHI nachgespalten (s. Sequenz, Fig. 7A(3')), der Vektor (pUC19 + Bindefragment) zirkularisiert und gemäß Standardmethoden in *E.coli* transformiert. Findet sich die RleAI-Erkennungssequenz terminal am Ende auch der synthetischen Oligonukleotide, kann man die DNA-Synthesereaktion wie in diesem Beispiel jeweils um einen Schritt verlängern.

Auswirkungen von DNA-Sequenzänderungen in der 5'-regulatorischen Region des 6-HDNO-Gens auf die Bindefähigkeit von NicR1

Um die Bindungseigenschaften von NicR1 zu charakterisieren, wurden Sequenzänderungen in die den σ^{70} -ähnlichen Promotor tragende IR1-Bindungsstelle eingeführt und die Länge der interpalindromischen Sequenz (IS, Fig. 7B-5, -6, -7) wurde variiert. durch letztere Versuche sollten die sterischen Anforderungen an die palindromische Bindesequenz IR1 untersucht werden. Sequenzmodifikationen, welche in das WT-6-HDNO-Promotorfragment eingeführt wurden sind in der Fig. 7 gezeigt.

Die Änderungen, die durch "rekursive DNA-Synthese in vitro" in die Sequenz des Promotor enthaltenden IR1-Palindroms und in die interpalindromische Sequenz eingeführt wurden sind in Fig. 7B dargestellt. Die Reduktion von IR1 auf ein Oktamer (Fig. 7B-3) wie auch die Deletion der zentralen G-Position (Fig. 7B-4) zerstören die Bindungsfähigkeit von NicR1 an IR1.

Setzt man die Spaltungsprodukte im Gelretentionsexperiment ein, so wird nur IR2 retardiert, nicht aber das mutierte IR1 enthaltende Fragment. Das in Fig. 7B-4 gezeigte Konstrukt zeigt Retention nur noch durch die Bindung von NicR1 an IR2. Da die Größe des Komplexes an IR2 die gleiche Größe hat wie der Komplex an IR1, ist dies ein Hinweis auf die Bindung des selben Proteins an beide Palindrome.

Entgegen dem ausgeprägten Effekt, der durch die Änderung sowohl der Länge, wie auch der Symmetrie des Palindroms IR1 auf die NicR1-Bindung erzeugt wird, führten Änderungen der Anzahl an Helixwindungen in den interpalindromischen Sequenzen zu keinem Unterschied der NicR1-Bindung an beide Palindrome. Die Länge der interpalindromischen Sequenz wurde durch Deletion wie auch Insertionen von je 5 bp (Fig. 7B- 6 und -7) verändert. Diese Änderungen entsprechen je einer halben Helixwindung. Als Konsequenz ergibt sich daraus, daß sich in diesen DNA-Mutanten die IR2-Bindungsstelle relativ zu der IR1-Bindungsstelle um 180° verdreht befindet. Zusätzlich wurde die 50 bp lange interpalindromische Sequenz um 20 bp reduziert (Fig. 7B- 5). Das Muster des Gelretentionsexperiments, welches diese Änderungen trägt (Fig. 7B- 5, -6, -7) war identisch mit dem Kontrollmuster, das mit dem unveränderten 242 bp 6-HDNO-Promotorfragment (Fig. 7B-1) zu sehen war.

Die rechte Hälfte von IR1 enthält die -10-Region des Promotors des 6-HDNO-Gens die sich von der Konsensussequenz des Promotors der σ^{70} -RNA-Polymerasen durch die Insertion einer Cytosin enthaltenden, zusätzlichen Basenposition in der TATAAAT-Sequenz unterscheidet (Fig. 7B-1). Es stellte sich die Frage, ob diese ungewöhnliche σ^{70} -10-Region an der Spezifität der NicR1-Bindung an IR1 Anteil hat. Im Gelretentionsexperiment (Fig. 7B-2) mit NicR1 zeigte die Deletion des Cytosinrestes an der entsprechenden Position (Fig. 7B-2) keine Änderung des Proteinbindungsmusters, verglichen mit dem Muster, das mit dem unveränderten DNA-

Fragment erhalten wurde, wohl aber bei der Bindung der σ^{70} -ähnlichen RNA-Polymerase von *E. coli*.

Die Aussage, daß die beiden Mutationen Fig. 7b-3 und -4 die NicR1-Bindfähigkeit an das Palindrom IR1 stark verringern, wenn nicht sogar ganz verhindern wird durch weitere, hier nicht beschriebene Versuche untermauert.

5

Literatur zum Beispiel

- Mauch L, Bichler V, and Brandsch R. (1990) Funktional analysis of the 5' regulatory region and the UUG translation initiation codon of the *Arthrobacter oxidans* 6-hydroxynicotine oxidase gene. *Mol Gen Genet* 221: 427–437.
- Bernauer, H., Mauch, L., and Brandsch, R. (1992) Interaction of the regulatory protein NicR1q with the promoter region of the pAO1-encoded 6-hydroxy-D-nicotine oxidase gene of *Arthrobacter oxidans*. *Mol Microbiol* 6: 1809–1820.
- Garner, M. M., and Revzin, A. (1981) A gel electrophoresis method for quantifying the binding of proteins to specific DNA regions: application to components of the *E. coli* lactose operon regulatory system. *Nucleic Acids Res* 9: 3047–3060.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J., and Messing, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequence of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33: 103–109.
- Vesely Z, Müller A, Schmitz G, Kaluza K, Jarsch M, Kessler C (1990) RleAI: a novel class-IIIS restriction endonuclease from *Rhizobium leguminosarum* recognizing 5'-CCCACA(N12/9)-3'. *Gene* 95: 129–131.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press 1: 1.25–1.28.

20

Literatur

25

- Bigey, P., G. Pratviel, et al. (1995). "Cleavage of doublestranded DNA by "metalloporphyrin-linker-oligonucleotide" molecules: influence of the linker. *Nucleic Acids Res* 23(19): 3894–900.
- Francois, J. C. and C. Helene (1995). "Recognition and cleavage of single-stranded DNA containing hairpin structures by oligonucleotides forming both Watson-Crick and Hoogsteen hydrogen bonds. *Biochemistry* 34(1): 65–72.
- Gao, X., A. Stassinopoulos, et al. (1995). "Structural basis for the sequence-specific DNA strand cleavage by the enediyne neocarzinostatin chromophore. Structure of the postactivated chromophore-DNA complex. *Biochemistry* 34(1): 40–9].
- Harford, C., S. Narindrasorasak, et al. (1996). "The designed protein M(II)-Gly-Lys-His-Fos (138–211) specifically cleaves the AP-1 binding site containing DNA. *Biochemistry* 35(14): 4271–8.
- Kane, S. A., S. M. Hecht, et al. (1995). "Specific cleavage of a DNA triple helix by FeIIbleomycin. *Biochemistry* 34(51): 16715–24.
- Norton, J. C., J. H. Waggenpack, et al. (1995). "Targeting peptide nucleic acid-protein conjugates to structural features within duplex DNA. *Bioorg Med Chem* 3(4): 437–45.
- Oikawa, S., M. Kurasaki, et al. (1995). "Oxidative and nonoxidative mechanisms of site-specific DNA cleavage induced by copper-containing metallothioneins. *Biochemistry* 34(27): 8763–70.
- Sergeev, D. S., T. S. Godovikova, et al. (1995). "[Cleavage of a double-stranded DNA target by bleomycin derivatives of oligonucleotides, forming a ternary complex]. *Bioorg Khim* 21(3): 188–96.
- Vesely Z, Müller A, Schmitz G, Kaluza K, Jarsch M, Kessler C (1990) RleAI : a novel class — IIS restriction endonuclease from *Rhizobium leguminosarum* recognizing 5'-CC-CACA(N12/9)-3', *Gene* 95: 129–131.

50

55

60

65

strangmolekül, wobei das mindestens eine Einzelstrangmolekül sich an den Überhang, gegebenenfalls nach dessen Generierung, gemäß (aa) oder an das glatte Ende, gegebenenfalls nach dessen Generierung, gemäß (ab) anlagert und seinerseits einen Überhang erzeugt und wobei das Einzelstrangmolekül bei Anlagerung an ein glattes Ende, oder bei sukzessiver Anlagerung und Verknüpfung mehrerer Einzelstrangmoleküle vor der Auffüllreaktion an dem vom Ende der Doppelstrangmoleküls entfernten Ende maskiert ist;

ba) Entfernung der Maskierung im Falle der sukzessiven Anlagerung mehrerer Einzelstränge jeweils vor deren Verknüpfung;

c) Auffüllen des zweiten, zum Einzelstrang in seiner Sequenz komplementären Nukleinsäurestranges durch eine Polymeraseaktivität;

d) Spaltung des mindestens einen in Schritt (c) erzeugten Nukleinsäure-Doppelstrangmoleküls an einer vorbestimmten Stelle, wobei mindestens ein neuer Überhang oder ein glattes Ende entsteht und wobei eine gegebenenfalls noch vorhandene Maskierung abgespalten wird;

e) gegebenenfalls ein- oder mehrmalige Wiederholung der Schritte (b), (c) und/oder (d), wobei in Schritt (b) jeweils geeignete Einzelstrangmoleküle eingesetzt werden;

f) Legierung von 3'-Hydroxy- und 5'-Phosphat-Enden von endständigen Nukleotiden benachbarter, in das Nukleinsäure-Doppelstrangmolekül inkorporierter Nukleinsäure-Einzelstrangmoleküle, sofern es sich um glatte Enden handelt, nach Schritt (b), (c), (d) und/oder (e); und

g) Isolierung des so erzeugten Nukleinsäure-Doppelstrangmoleküls.

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei nicht in das Nukleinsäure-Doppelstrangmolekül inkorporierte Nukleinsäure-Einzelstrangmoleküle nach Schritt (b), (ba), (c), und/oder Schritt (d) abgetrennt werden.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei 3'-Hydroxy- und 5'-Phosphat-Enden von endständigen Nukleotiden benachbarter, in das Nukleinsäure-Doppelstrangmolekül inkorporierter Nukleinsäure-Einzelstrangmoleküle durch eine Ligaseaktivität miteinander verknüpft werden, sofern das Einzelstrangmolekül bei seiner Anlagerung an das Doppelstrangmolekül an einen Überhang angelagert wurde.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die Nukleinsäure DNA ist.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die Nukleinsäure RNA ist.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei mindestens einer der Überhänge ein 3'-Überhang ist.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei mindestens einer der Überhänge ein 5'-Überhang ist.

8. Verfahren nach Anspruch 1—7, wobei das Nukleinsäure-Einzelstrangmolekül an seinem 5'-Ende maskiert ist.

9. Verfahren nach Anspruch 8, wobei die Maskierung durch den Einbau mindestens eines 5'-modifizierten Nukleotids erfolgt.

10. Verfahren nach Anspruch 7, wobei der Einzelstrang an dem vom Doppelstrang nach Anlagerung entfernten Ende eine Haarnadelschleife ausbildet, die als Primer für die Polymeraseaktivität dient.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, wobei die Spaltung an einer vorbestimmten Stelle in Schritt (d) durch eine Sequenzspezifisch spaltende trippelhelikale DNA erfolgt.

12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, wobei die Spaltung an einer vorbestimmten Stelle in Schritt (d) durch eine Typ II S Restriktionsendonuklease erfolgt.

13. Verfahren nach Anspruch 12, wobei die Typ II S Restriktionsendonuklease das Rle AI-Enzym aus *Rhizobium leguminosarum* ist.

14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13, wobei das Nukleinsäure-Doppelstrangmolekül und/oder die Nukleinsäure-Einzelstrangmoleküle synthetischen oder Semisynthetischen Ursprungs sind.

15. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14, wobei nach Schritt (g) folgender Schritt durchgeführt wird:

h) Denaturierung des Nukleinsäure-Doppelstrangmoleküls und Isolierung der Nukleinsäure-Einzelstrangmoleküle.

16. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 15, wobei die Synthese zumindest teilweise automatisiert ist.

17. Verfahren nach Anspruch 16, wobei die Synthese matrixgebunden durchgeführt wird.

18. Verfahren nach Anspruch 17, wobei die Matrix eine Nylonoberfläche ist.

19. Kit mindestens enthaltend

a) eine Ligase sowie einen Ligasepuffer;

b) eine Polymerase sowie einen für die erfindungsgemäße Synthese geeigneten Polymerasepuffer;

c) gegebenenfalls ein Typ II S-Restriktionsenzym sowie einen geeigneten Restriktionspuffer;

d) gegebenenfalls einen Waschpuffer zur Elution von Reaktionsnebenprodukten und nicht in das Produkt der erfindungsgemäßen Synthese eingebautem Material; und

e) gegebenenfalls eine Synthesematrix mit einem gegebenenfalls bereits daran gebundenen Nukleinsäure-Doppelstrangmolekül als Startermolekül.

Hierzu 6 Seite(n) Zeichnungen

Fig. 1

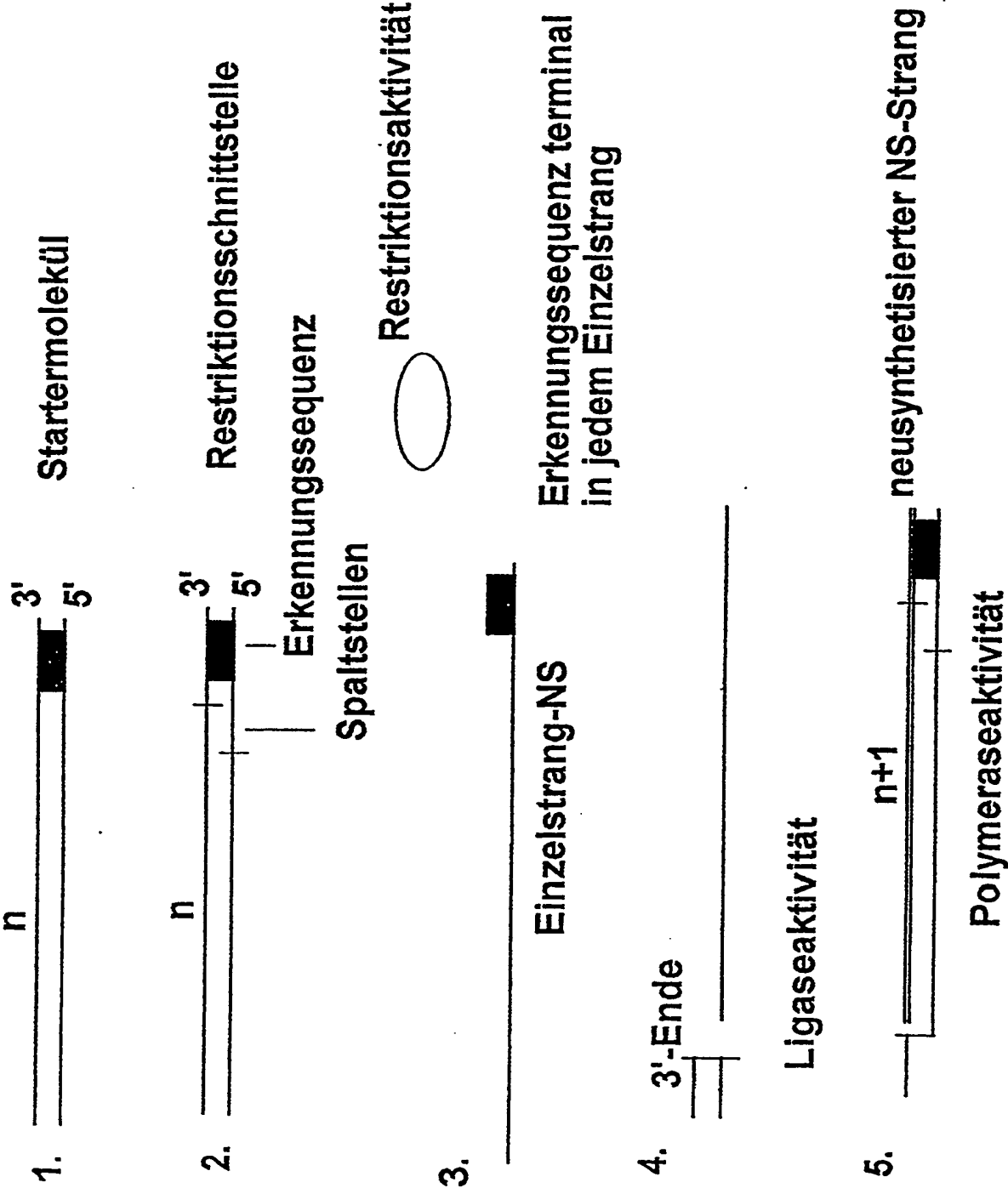


Fig. 2

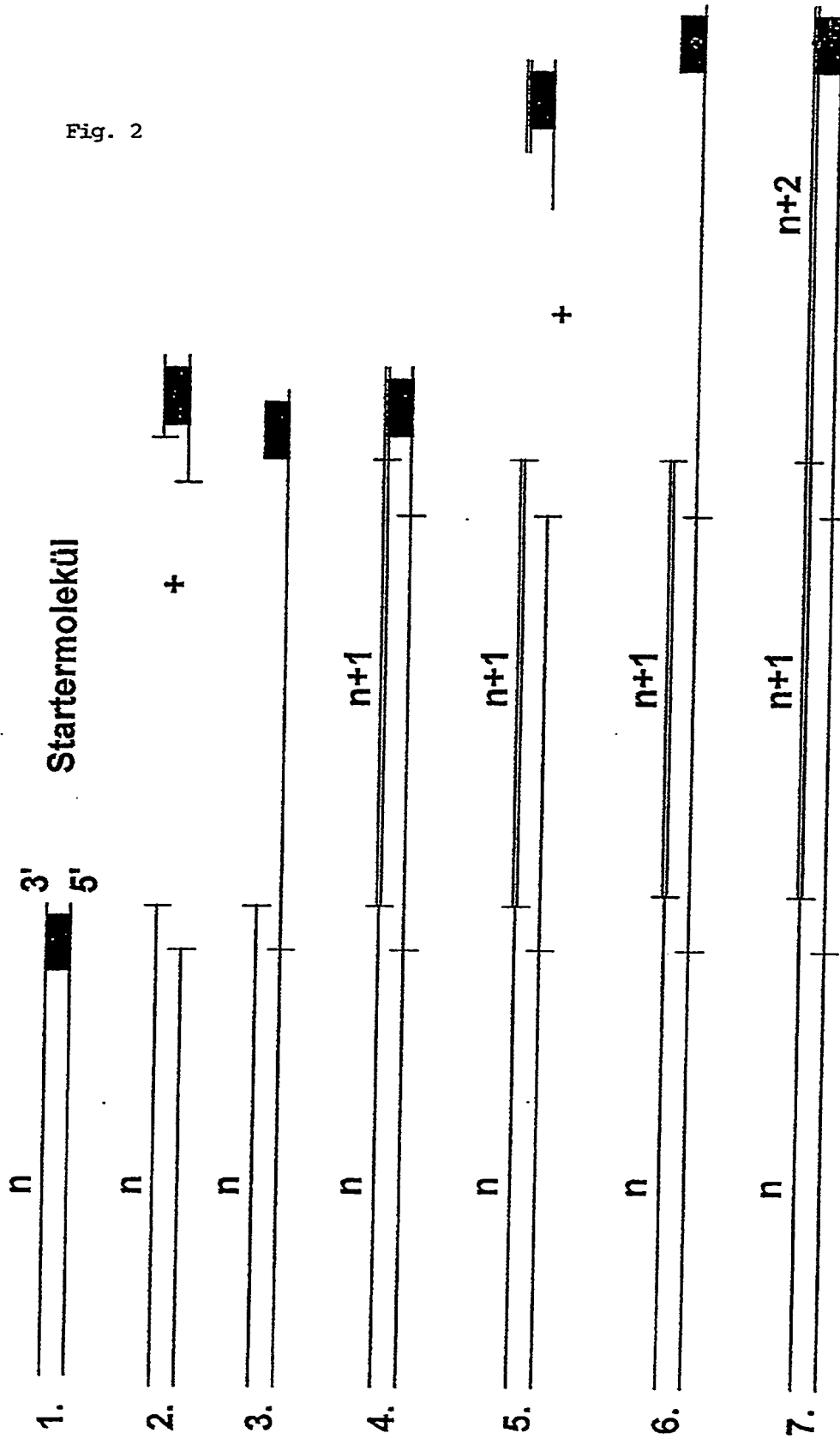


Fig. 3

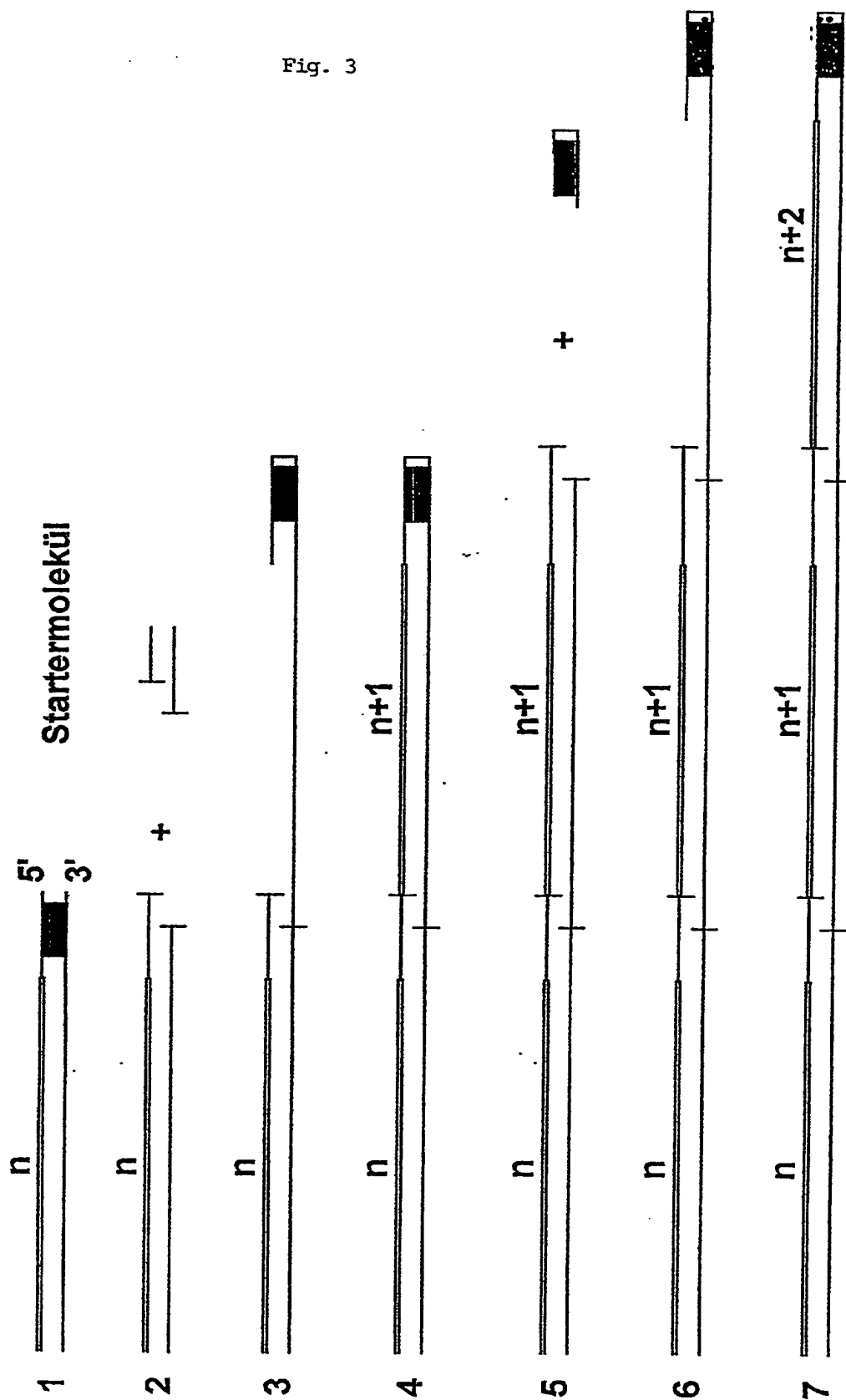


Fig. 4

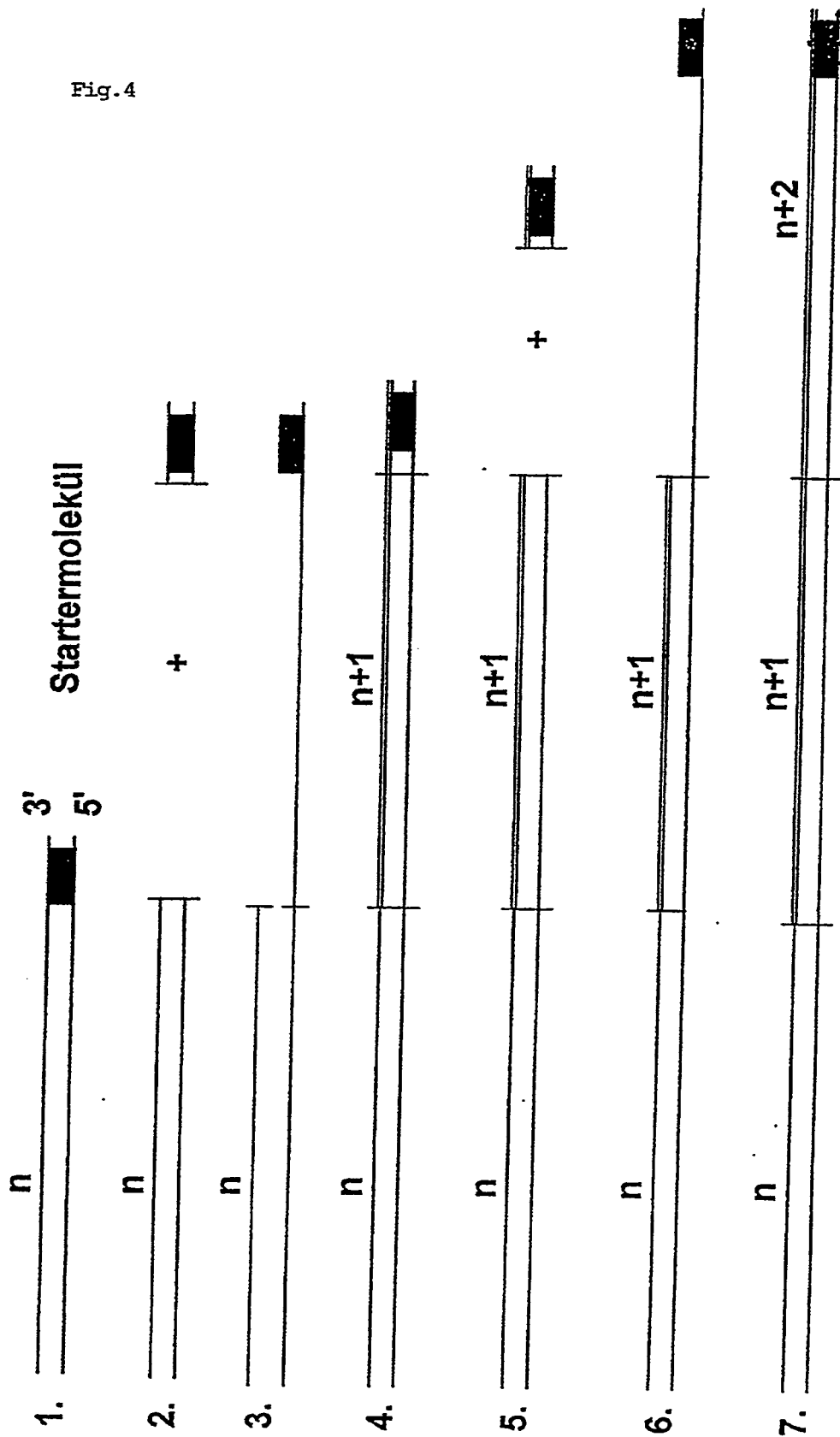


Fig.5

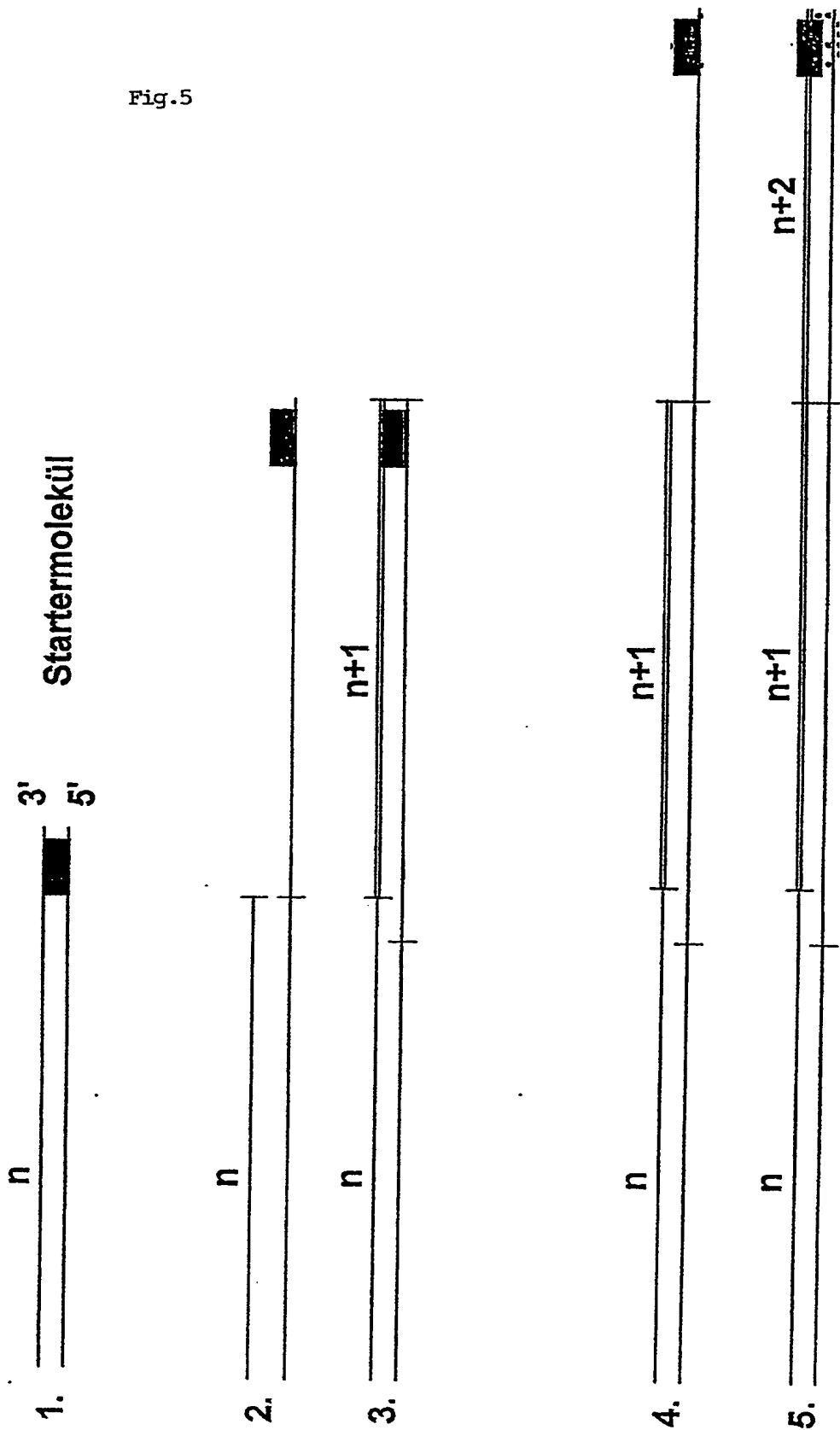


Fig. 6

